

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
3. Juli 2003 (03.07.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 03/054224 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12Q 1/68, B01L 3/00

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE02/04507

(22) Internationales Anmeldedatum:
5. Dezember 2002 (05.12.2002)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
101 60 983.3 5. Dezember 2001 (05.12.2001) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): EPIGENOMICS AG [DE/DE]; Kastanienallee 24,
10435 Berlin (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BERLIN, Kurt
[DE/DE]; Marienkäferweg 4, 14532 Stahnsdorf (DE).

(74) Anwalt: SCHUBERT, Klemens; Neue Promenade 5,
10178 Berlin-Mitte (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu
veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: METHOD AND INTEGRATED DEVICE FOR THE DETECTION OF CYTOSINE METHYLATIONS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN UND INTEGRIERTE VORRICHTUNG ZUM NACHWEIS VON CYTOSINMETHYLIERUNGEN

(57) Abstract: The invention relates to a method for detecting DNA polymorphisms and cytosine methylation, consisting of the following steps: a) DNA is extracted from a sample for analysis; b) if a cytosine methylation analysis is carried out, the DNA is chemically and/or enzymatically treated; c) the DNA is amplified in a polymerase reaction using a dissolved primer, and another primer is attached to the surface of a solid phase. At least one of the primers consists of two domains. The domain located at the 3' end hybridizes with the DNA, whereas the domain located at the 5' end does not hybridize; d) the DNA amplified in step c) is amplified once again. The primers of the second amplification hybridize with the domain located at the 5' end of at least one of the first primers or are identical therewith. The primers used for the second amplification contain a detectable marker; e) the amplified substances are hybridized with oligonucleotides and/or PNA oligomers that are bound to a solid phase which does not act as a primer during amplification. Sequential features or methylation patterns are detected by means of the hybridization.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung beschreibt ein Verfahren zum Nachweis von DNA-Polymorphismen und Cytosin-Methylierung, dadurch gekennzeichnet, dass man die folgenden Schritte ausführt: a) man gewinnt die zu untersuchende DNA aus einer Probe; b) die zu untersuchende DNA wird, falls eine Cytosin-Methylierungsanalyse durchgeführt werden soll, chemisch und/oder enzymatisch behandelt; c) die zu untersuchende DNA wird in einer Polymerasereaktion amplifiziert, wobei ein Primer in Lösung vorliegt und ein Primer an die Oberfläche einer Festphase gebunden ist und wobei mindestens einer der Primer aus zwei Domänen besteht, wobei die am 3'-Ende befindliche an die zu untersuchende DNA hybridisiert, während die am 5'-Ende befindliche nicht hybridisiert; d) die in Schritt c) amplifizierte DNA wird erneut amplifiziert, wobei die Primer dieser zweiten Amplifikation an die am 5'-Ende befindliche Domäne mindestens eines der ersten Primer hybridisieren oder zu ihr identisch sind und wobei diese Primer für die zweite Amplifikation mit einer nachweisbaren Markierung versehen sind; e) die Amplifikate werden an Oligonukleotide und/oder PNA-Oligomere hybridisiert, welche an eine Festphase gebunden sind, die in der Amplifikation nicht als Primer fungieren, und aus der Hybridisierung auf Sequenzmerkmale oder Methylierungsmuster der zu untersuchenden DNA geschlossen.

WO 03/054224 A2

Verfahren und Integrierte Vorrichtung zum Nachweis von Cytosinmethylierungen

5

Gebiet der Erfindung

Die nach den methodischen Entwicklungen der letzten Jahre in der Molekularbiologie gut studierten Beobachtungsebenen sind die Gene selbst, die Übersetzung dieser Gene in RNA und die daraus entstehenden Proteine. Wann im Laufe der Entwicklung eines Individuums welches Gen angeschaltet wird und wie Aktivieren und Inhibieren bestimmter Gene in bestimmten Zellen und Geweben gesteuert wird, ist mit Ausmaß und Charakter der Methylierung der Gene bzw. des Genoms korrelierbar. Insofern äußern sich pathogene Zustände in einem veränderten Methylierungsmuster einzelner Gene oder des Genoms.

Die vorliegende Erfindung beschreibt ein Verfahren zur Detektion des Methylierungszustandes genomischer DNA Proben.

Stand der Technik

5-Methylcytosin ist die häufigste kovalent modifizierte Base in der DNA eukaryotischer Zellen. Sie spielt beispielsweise eine Rolle in der Regulation der Transkription, beim genetischen Imprinting und in der Tumorgenese. Die Identifizierung von 5-Methylcytosin als Bestandteil genetischer Information ist daher von erheblichem Interesse. 5-Methylcytosin-Positionen können jedoch nicht durch Sequenzierung identifiziert werden, da 5-

Methylcytosin das gleiche Basenpaarungsverhalten aufweist wie Cytosin. Darüber hinaus geht bei einer PCR-Amplifikation die epigenetische Information, welche die 5-Methylcytosine tragen, vollständig verloren.

5

Eine relativ neue und die mittlerweile am häufigsten angewandte Methode zur Untersuchung von DNA auf 5-Methylcytosin beruht auf der spezifischen Reaktion von Bisulfit mit Cytosin, das nach anschließender alkalischer Hydrolyse in Uracil umgewandelt wird, welches in seinem Basenpaarungsverhalten dem Thymidin entspricht. 5-Methylcytosin wird dagegen unter diesen Bedingungen nicht modifiziert. Damit wird die ursprüngliche DNA so umgewandelt, dass Methylcytosin, welches ursprünglich durch sein Hybridisierungsverhalten vom Cytosin nicht unterschieden werden kann, jetzt durch „normale“ molekularbiologische Techniken als einzig verbliebenes Cytosin beispielsweise durch Amplifikation und Hybridisierung oder Sequenzierung nachgewiesen werden kann. Alle diese Techniken beruhen auf Basenpaarung, welche jetzt voll ausgenutzt wird.

Die Bisulfit-Technik wird bisher bis auf wenige Ausnahmen (z. B. Zechnik, M. et al., Eur. J. Hum. Gen. 1997, 5, 94-98) nur in der Forschung angewendet. Immer aber werden kurze, spezifische Stücke eines bekannten Gens nach einer Bisulfit-Behandlung amplifiziert und entweder komplett sequenziert (Olek, A. und Walter, J., Nat. Genet. 1997, 17, 275-276) oder einzelne Cytosin-Positionen durch eine „Primer-Extension-Reaktion“ (Gonzalzo, M. L. und Jones, P. A., Nucl. Acids Res. 1997, 25, 2529-2531, WO-Patent 9500669) oder einen Enzymschnitt (Xiong, Z. und Laird, P. W., Nucl. Acids. Res. 1997, 25, 2532-2534) nachgewiesen.

Zudem ist auch der Nachweis durch Hybridisierung beschrieben worden (Olek et al., WO 99/28498).

5 Weitere Publikationen, die sich mit der Anwendung der Bisulfit-Technik zum Methylierungsnachweis bei einzelnen Genen befassen, sind: Xiong, Z. und Laird, P. W. (1997), Nucl. Acids Res. 25, 2532; Gonzalgo, M. L. und Jones, P. A. (1997), Nucl. Acids Res. 25, 2529; Grigg, S. und Clark, S. (1994), Bioassays 16, 431; Zeschnik, M. et al. 10 (1997), Human Molecular Genetics 6, 387; Teil, R. et al. (1994), Nucl. Acids Res. 22, 695; Martin, V. et al. (1995), Gene 157, 261; WO 97/46705, WO 95/15373 und WO 95/45560.

15 Der Stand der Technik, was die Empfindlichkeit betrifft, wird durch ein Verfahren definiert, welches die zu untersuchende DNA in einer Agarose-Matrix einschließt, dadurch die Diffusion und Renaturierung der DNA (Bisulfit reagiert nur an einzelsträngiger DNA) verhindert und alle 20 Fällungs- und Reinigungsschritte durch schnelle Dialyse ersetzt (Olek, A. et al., Nucl. Acids. Res. 1996, 24, 5064-5066). Mit dieser Methode können einzelne Zellen untersucht werden, was das Potential der Methode veranschaulicht. Allerdings werden bisher nur einzelne Regionen 25 bis etwa 3000 Basenpaare Länge untersucht, eine globale Untersuchung von Zellen auf Tausenden von möglichen Methylierungsanalysen ist nicht möglich.

30 PCR Reaktionen (Polymerase Kettenreaktionen) werden normalerweise mit zwei spezifisch bindenden Primern durchgeführt, wobei einer komplementär zum (+)-Strang, der andere komplementär zum (-) Strang des zu amplifizierenden

Templates ist. Das Ziel einer solchen Amplifikation ist es, ein bestimmtes Fragment der Templat DNA zu vervielfältigen, das in der Regel genau definiert und in seiner Basensequenz zum großen Teil oder vollständig bekannt ist.

Es sind auch PCR Reaktionen bekannt, die mehr als zwei verschiedene Primer einsetzen. Meist dienen sie zur Amplifikation mehrerer, ebenfalls wenigstens zum großen Teil in ihrer Basensequenz bekannter Fragmente gleichzeitig in einem Gefäß. Auch in diesem Fall binden die eingesetzten Primer spezifisch an bestimmte Abschnitte der Templat DNA.

Die von der Firma Epigenomics AG entwickelte Hybridisierungskammer (DE19952723) führt ein periodisches Denaturieren der DNA-Probe durch, ohne eine Ablösung bereits an Oligomere hybridisierter DNA zu erzeugen. Dadurch, daß die DNA-Probe vor dem Aufbringen auf den Array thermisch denaturiert und dann plötzlich abgekühlt wird, liegt sie bei Kontaktierung mit dem Array überwiegend in einzelsträngiger Form vor. Damit steht ein großer Teil der ansonsten doppelsträngigen DNA-Probe für Hybridisierungen mit dem Oligomer-Array zur Verfügung. Durch Hin- und Herpumpen der Probenflüssigkeit stellt die Vorrichtung sicher, daß dieser Vorgang so häufig wiederholt wird, bis ein ausreichender Teil der doppelsträngigen DNA-Probe an die Oligomere des Arrays hybridisiert hat. Zugleich findet durch diesen Prozeß ein Mischen in der Kammer während der Hybridisierungsphase statt.

Eine Übersicht über den Stand der Technik in der Oligomer Array Herstellung läßt sich aus einer im Januar 1999 erschienenen Sonderausgabe von Nature Genetics (Nature Genetics Supplement, Volume 21, January 1999), der dort zitierten Literatur und dem US-Patent 5994065 über Methoden zur Herstellung von festen Trägern für Zielmoleküle wie Oligonukleotide entnehmen. Neben Desoxyribonucleic Acids (DNA) können auch Peptide Nucleic Acids (PNA) auf der Oberfläche von Oligomer-Arrays fixiert werden.

In situ Amplifikationen sind in der Literatur zahlreich beschrieben (Tsongalis, G. J. und Silvermann L. M., Ann. Clin. Lab. Sci 1994, 24, 436-440). In situ Reaktionen sind jedoch bisher dadurch gekennzeichnet, dass PCR und Hybridisierung in getrennten Reaktionsgefäßen erfolgen.

Genomische DNA wird durch Standardmethoden aus DNA von Zell-, Gewebe- oder sonstigen Versuchsproben gewonnen. Diese Standardmethodik findet sich in Referenzen wie Fritsch und Maniatis eds., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 1989.

Kodierte Partikel (Beads) finden schon seit einiger Zeit in sehr unterschiedlichen Gebieten ihre Anwendung. Farbkodierte Beads sind zur parallelen Diagnostik von T- und B-Zellen eingesetzt worden (Baran und Parker, Am. J. Clin. Pathol. 1985, 83, 182-9). Mit radioaktivem Indium versetzte Beads sind als Indikatoren der Motilität des gastrointestinalen Trakts verwendet worden (Dormehl et al Eur. J. Nucl. Med. 1985, 10, 283-5). Firmen wie Luminex oder Illumina, die mit farbkodierten Kunststoffkügelchen hoch-parallele Diagnostik betreiben, verwenden 100 ver-

5 schieden farbmarkierte Beads, an denen entsprechend viele verschiedene Sonden angebracht werden können. Dadurch können in einer Reaktion 100 verschiedene Parameter abgefragt werden, was z.B. 100 verschiedene diagnostische Tests sein könnten.

Aufgabenstellung

10 Die vorliegende Erfindung soll ein Verfahren bereitstellen, welches sich zum Nachweis von DNA-Polymorphismen und Cytosin-Methylierungen in genomischen DNA-Proben besonders eignet. Zur Durchführung des Verfahrens soll bevorzugt eine Vorrichtung zur Analyse von DNA Proben verwendet werden, die sowohl die Amplifikation von DNA Fragmenten und die Analyse von DNA-Polymorphismen und Cytosin-Methylierungen in einem Gefäß mittels immobilisierter Primer und Sonden ermöglicht.

Beschreibung

20 Die Aufgabe wird erfindungsgemäß durch ein Verfahren zum Nachweis von DNA-Polymorphismen und Cytosin-Methylierung gelöst, wobei man die folgenden Schritte ausführt:

25 a) man gewinnt die zu untersuchende DNA aus einer Probe;
b) die zu untersuchende DNA wird in einer Polymeraseraktion amplifiziert, wobei ein Primer in Lösung vorliegt und ein Primer an die Oberfläche einer Festphase gebunden ist und wobei mindestens einer der Primer aus zwei Domänen besteht, wobei die am 3'-Ende befindliche an die zu untersuchende DNA hybridisiert, während die am 5'-Ende befindliche nicht hybridisiert;

30 c) die in Schritt b) amplifizierte DNA wird erneut amplifiziert, wobei die Primer dieser zweiten Amplifikation an

die am 5'-Ende befindliche Domäne mindestens eines der ersten Primer hybridisieren oder zu ihr identisch sind und wobei diese Primer für die zweite Amplifikation mit einer nachweisbaren Markierung versehen sind;

- 5 d) die Amplifikate werden an Oligonukleotide und/oder PNA-Oligomere hybridisiert, welche an eine Festphase gebunden sind, die in der Amplifikation nicht als Primer fungieren, und aus der Hybridisierung auf Sequenzmerkmale oder Methylierungsmuster der zu untersuchenden DNA geschlossen.
- 10

Besonders bevorzugt ist es erfindungsgemäß, dass man in Schritt a) die zu untersuchende DNA nach der Gewinnung chemisch und/oder enzymatisch behandelt.

15

Eine besonders bevorzugte Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahren zum Nachweis von DNA-Polymorphismen und Cytosin-Methylierung ist dadurch gekennzeichnet, dass man die folgenden Schritte ausgeführt:

- 20 - man gewinnt die zu untersuchende DNA aus einer Probe;
- die zu untersuchende DNA wird, falls eine Cytosin-Methylierungsanalyse durchgeführt werden soll, chemisch und/oder enzymatisch behandelt;
- die zu untersuchende DNA wird in einer Polymeraseraktion amplifiziert, wobei ein Primer in Lösung vorliegt und ein Primer an die Oberfläche einer Festphase gebunden ist
- 25 und wobei mindestens einer der Primer aus zwei Domänen besteht, wobei die am 3'-Ende befindliche an die zu untersuchende DNA hybridisiert, während die am 5'-Ende befindlich nicht hybridisiert;
- 30 - die im vorherigen Schritt amplifizierte DNA wird erneut amplifiziert, wobei die Primer dieser zweiten Amplifikation an die am 5'-Ende befindliche Domäne mindestens eines der ersten Primer hybridisieren oder zu ihr identisch sind und wobei diese Primer für die zweite Amplifikation mit einer nachweisbaren Markierung versehen sind;
- 35

- die Amplifikate werden an Oligonukleotide und/oder PNA-Oligomere hybridisiert, welche an eine Festphase gebunden sind, die in der Amplifikation nicht als Primer fungieren, und aus der Hybridisierung auf Sequenzmerkmale oder Methylierungsmuster der zu untersuchenden DNA geschlossen.

Bevorzugt ist weiterhin, dass die Primer der ersten Amplifikation (Schritt b) und die Oligonukleotide (Schritt d) auf derselben Festphase immobilisiert sind.

Erfindungsgemäß bevorzugt ist ferner, dass die Festphase eben ist. Weiterhin ist erfindungsgemäß besonders bevorzugt, dass die Festphase aus Glas, Metall, insbesondere Gold oder Kunststoff ist.

Besonders bevorzugt ist auch, dass Beads als Festphase verwendet werden, wobei jeder Bead unterschiedlich codiert ist. Hierbei ist insbesondere bevorzugt, dass die Beads über Fluoreszenzfarbstoffe, über absorbierende Farbstoffe, über Chemiluminiszenz, über Transponder, über Nuklide codiert sind oder über chemische Markierungen, welche sich massenspektrometrisch nachweisen lassen.

Ganz besonders bevorzugt ist es erfindungsgemäß, dass die Oberfläche derart chemisch behandelt ist, dass die Oligonukleotide und Primer kovalent daran gebunden werden können.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ferner eine Vorrichtung, bestehend aus

- a) einer Oberfläche, auf welcher Primeroligonukleotide mit ihrem 5'-Ende immobilisiert sind und zusätzlich Oligonukleotide und/oder PNA-Oligomere, welche von einer Polymerase nicht verlängert werden können;
- b) einer Kammer, wobei die Oberfläche eine Wand dieser

Kammer bildet;

c) einer Temperierungseinheit, welche die Kammertemperatur steuert;

5 d) einem System, welches der Kammer Flüssigkeiten zuführt.

Beschrieben wird somit ein Verfahren zum Nachweis von DNA-Polymorphismen und Cytosin-Methylierungen, dadurch gekennzeichnet, dass die folgenden Schritte ausgeführt werden:

10

Im ersten Verfahrensschritt wird die zu untersuchende DNA aus einer Probe gewonnen.

15 Die zu analysierende genomische DNA wird bevorzugt aus den üblichen Quellen für DNA erhalten, wie z. B. Zelllinien, Blut, Sputum, Stuhl, Urin, Gehirn-Rückenmarks-Flüssigkeit, in Paraffin eingebettetes Gewebe, beispielsweise Gewebe von Augen, Darm, Niere, Hirn, Herz, Prostata, Lunge, Brust oder Leber, histologische Objektträger

20 und alle möglichen Kombinationen hiervon. Die DNA kann auch bereits aufgearbeitet oder isoliert vorliegen.

Im optionalen zweiten Verfahrensschritt wird die zu untersuchende DNA, falls eine Cytosin-Methylierungsanalyse durchgeführt werden soll, chemisch und/oder enzymatisch behandelt.

25

Die chemische Behandlung der eingesetzten DNA erfolgt bevorzugt mit Bisulfit (= Disulfit, Hydrogensulfit) derart, dass alle nicht an der 5-Position der Base methylierten Cytosine so verändert werden, dass eine hinsichtlich dem Basenpaarungsverhalten unterschiedliche Base entsteht,

30

während die in 5-Position methylierten Cytosine unverändert bleiben.

Die enzymatische Behandlung erfolgt bevorzugt mit methylierungssensitiven Restriktionsenzymen, die zwischen methylierter und nicht methylierter DNA unterscheiden können.

Im nächsten Verfahrensschritt wird die zu untersuchende DNA in einer Polymeraseraktion amplifiziert, wobei ein Primer in Lösung vorliegt und ein Primer an die Oberfläche einer Festphase gebunden ist und wobei mindestens einer der Primer aus zwei Domänen besteht, wobei die am 3'-Ende befindliche Domäne an die zu untersuchende DNA hybridisiert, während die am 5'-Ende befindliche Domäne nicht hybridisiert.

Die Immobilisierung der amplifizierten Abschnitte auf einer Festphase, erfolgt über zumindest einen in der Amplifikation verwendeten Primer. Die Bindung des Primers erfolgt vorzugsweise durch chemische Reaktionen (z.B. durch die Einführung einer C6 5'-Aminofunktion).

Vorzugsweise werden bei der vorliegenden Erfindung Domänenprimer verwendet, die selbst nicht methylierungsspezifisch sind, sondern vielmehr nur spezifisch sind für die chemisch (Bisulfit) behandelte DNA. Dies wird auch durch deren bevorzugte Sequenzzusammensetzung deutlich. In der 3'Domäne sind bevorzugt entweder nur die Basen C, A und T oder aber die Basen G, A und T enthalten, wie es bisulfitbehandelter DNA entspricht. In der 5'Domäne hingegen sind bevorzugt alle vier Basen A, C, G und T enthalten.

Mit den aus zwei Domänen bestehenden Primern können besonders spezifische zwei-Stufen-Amplifikationen durchgeführt werden, die besonders spezifisch eine Vielzahl von
5 Fragmenten gleichzeitig bereitstellen und die zugleich das Problem löst, dass normalerweise eine Vielzahl von markierten und entsprechend teuren Primern für eine solche komplexe Amplifikation eingesetzt werden müssen.

10 Im weiteren Verfahrensschritt wird die im vorherigen Schritt amplifizierte DNA erneut amplifiziert, wobei die Primer dieser zweiten Amplifikation an die am 5'-Ende befindliche Domäne mindestens eines der ersten Primer hybridisieren oder zu ihr identisch sind und wobei diese
15 Primer für die zweite Amplifikation mit einer nachweisbaren Markierung versehen sind.

Die Amplifikation der DNA in den beiden vorherigen Verfahrensschritten erfolgt vorzugsweise in einer Polymerasekettenreaktion, bevorzugt mit einer hitzebeständigen
20 DNA-Polymerase. Die Amplifikation von mehreren DNA-Abschnitten wird vorzugsweise in einem Reaktionsgefäß gemacht.

25 Die Markierung der PCR-Produkte erfolgt bevorzugt über absorbierende Farbstoffe und/oder über Chemilumineszenz und/oder über radioaktive Isotope und/oder über Fluoreszenzmarkierungen.

30 Vorzugsweise wird der Fluoreszenzmarker durch ein fluoreszenzmarkiertes Nukleotid wie z. B. Cy5-dCTP eingeführt.

Im weiteren Verfahrensschritt werden die Amplifikate an Oligonukleotide und/oder PNA-Oligomere hybridisiert, welche an eine Festphase gebunden sind, die in der Amplifikation nicht als Primer fungieren, und aus der Hybridisierung auf Sequenzmerkmale oder Methylierungsmuster der zu untersuchenden DNA geschlossen.

Die hybridisierten Oligonukleotide können am 3'-Ende beispielsweise mit folgenden Modifikationen versehen sein: Amino, Phosphat, Thiophosphat, Didesoxy, Carboxy, Dihydroxy, O-Acetyl oder Alkyl.

In einer besonders bevorzugten Variante des Verfahrens werden DNA-Polymorphismen und Cytosin-Methylierungen in einem Experiment analysiert.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ferner eine wie in Fig. 4 schematisierte Vorrichtung zur in situ Amplifikation und Analyse von DNA Proben. Sie besteht aus einer geschlossenen und temperierbaren Hybridisierungskammer, einer Pumpe, einem Heizelement und einem Kühlelement, die jeweils miteinander durch Flüssigkeit fördernde Leitungswege, bevorzugt Kunststoffschläuche verbunden sind (DE 19952723 A1) und einem handelsüblichen Objektträger (Oligonukleotid-Array), auf dem DNA-Oligomere, die als Primer in einer Polymeraseraktion fungieren können, und PNA-Oligomere oder DNA-Oligomere, die nicht als Primer in einer Polymeraseraktion fungieren können, angeordnet sind.

Besonders bevorzugt beträgt das Volumen, das die Hybridisierungskammer bei eingelegtem Oligomer-Array faßt, weniger als 200 µl.

- 5 Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist weiterhin eine Vorrichtung zur Analyse von DNA Proben. Diese besteht mindestens aus einer Oberfläche, auf der DNA-Oligomere, die als Primer in einer Polymeraseraktion fungieren können, und PNA-Oligomere oder DNA-Oligomere, die nicht als
10 Primer in einer Polymeraseraktion fungieren können, angeordnet sind.

Das besonders bevorzugte Hin- und Herpumpen der Probenflüssigkeit in der Vorrichtung stellt sicher, daß ein
15 ausreichender Teil der doppelsträngigen DNA-Probe an die Oligomere des Arrays hybridisiert.

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung:

- 20 Beispiel 1: Amplifikation immobilisierter DNA-Fragmente
Herstellung des ESR1 (Acc. No. EP11141) PCR-Produkts
Die DNA Fragmente, von denen nur ein Strang verwendet wird, werden für eine kovalente Bindung mit Isothiocyanatgruppen auf der benutzten Lysinoberfläche mit einer
25 Aminomodifikationen am 5'-Ende versehen. Die entsprechenden PCR Produkte müssen mit Fluoreszenzmarkern zur Kontrolle des Bindungsvorgangs versehen werden, wobei die Glasoberflächen auf das Vorhandensein eines Fluoreszenzsignals geprüft werden.
30

PCR Bedingungen: 2 µl DNA (20 ng) (Bisulfit behandelt);
0.4 µl Taq (2 units, Qiagen); 0,4 µl dNTP (jeweils 25

mmol/l, MBI Fermentas) 0,25 mmol/l Endkonzentration; 2 µl
 Primer1 (12,5 pmol/µl) 0,5 pmol/µl Endkonzentration; 2 µl
 Primer2 (12,5 pmol/µl) 0,5 pmol/µl Endkonzentration; 5 µl
 10x PCR Puffer (Qiagen); 1 µl MgCl (15 mmol/l, Qiagen)
 5 2,0 mmol/l Mg²⁺ Endkonzentration; 1 µl dATP Fluorescein
 (0,05 mmol/l) 0,5 µmol/l Endkonzentration und 36,2 µl
 ddH₂O

PCR-Programm: 95°C für 15:00 min; 95°C für 1:00 min; 55
 0 °C für 0:45 min; 72°C für 1:15 min; Zyklen:40; 72°C für
 10:00 min; 4°C für den Endpunkt

Primeroligonukleotide (siehe auch Fig. 1)

PCR Set	Primer Nr.	Primer Name	Sequenz
1	R77	ER1-B-U*-M13-A**	GTAAAACGACGGCCAGTAGGAGGGGGAATTAAATAGA
	R74	ER1-B-L*-M13	CAGGAAACAGCTATGACACAATAAAACCATCCCAAATAC
2	R73	ER1-B-U-M13	GTAAAACGACGGCCAGTAGGAGGGGGAATTAAATAGA
	R78	ER1-B-L-M13-A**	CAGGAAACAGCTATGACACAATAAAACCATCCCAAATAC

*U markiert den oberen Strang (forward), L markiert
 15 den unteren Strang (reverse)
 **A markiert die Primer mit der Aminomodifikation am
 5'-Ende

Immobilisierung der PCR-Produkte auf Oberflächen (Beads)
 20

Die gereinigten PCR-Produkte wurden für die Immobilisie-
 rung auf Glasoberflächen (Beads) verwendet. Sie unter-
 schieden sich nur in ihrer 5'-Modifikation. Ein Produkt
 hatte die NH₂ Gruppe am 5'-Ende des oberen Strangs (for-
 25 ward), das andere hatte diese Gruppe am 5'-Ende des unteren

ren Strangs (reverse). Während der Versuchsdurchführung wurden Doppelstränge gebunden, nach dem Denaturieren und Waschen werden jedoch zwei verschiedene Einzelstränge immobilisiert. Der Erfolg dieses Bindungsvorgangs wurde über Fluoreszenzmessungen bestimmt. Erstens konnte ein Fluoreszenzsignal der Beads nachgewiesen werden. Zweitens konnte eine Abnahme des Fluoreszenzsignals des Immobilisierungspuffers gegenüber einem Kontrollpuffer gezeigt werden.

10

18 µl gereinigtes PCR Produkt wurde zu 28 µl Immobilisierungspuffer (0,5 molares EDTA; 2,1% Methylimidazol; 0,06% Tween) gegeben. Dann wurden 23 µl der Mischung zu 42 mg PITC (Phenylendiisothiocyanat) modifizierten Beads (n=30) in Reaktionsgefäße gegeben und bei 28 °C über Nacht inkubiert. Danach wurde mit 1% Ammoniaklösung für 20 min deaktiviert.

15

20 Immobilisierung der PCR-Produkte auf verschiedenen Oberflächen

In einem Vergleichsexperiment wurden die unterschiedlichen Bindungseigenschaften von Amino modifiziertem und unmodifiziertem PCR Produkt untersucht. Dabei wurde die Spezifität für drei verschiedene Oberflächen getestet: Lysin modifizierte, Isothiocyanat (PITC) modifizierte und mit Primern beladene und deaktivierte Glassoberflächen.

25

30 40 µl gereinigtes PCR-Produkt (~0,25 pmol/µl) wurden mit 50 µl Immobilisierungspuffer gemischt, 42 mg Beads (n=30) wurden in ein Reaktionsgefäß gegeben, 30 µl des Gemisches zugegeben und bei 28 °C zwei Nächte inkubiert.

DNA Oberfläche	PCR-Produkt ohne Aminomodifikation Produkt Nr. 2	PCR-Produkt mit Aminomodifikation Produkt Nr. 1
Lysin	A	B (siehe Fig. 2)
PITC	C	D
PITC-ESR1-Primer	E	F

Denaturierung des immobilisierten PCR-Produkts

5 Die Beads wurden mehrere Male in den Reaktionsgefäßen unter Denaturierungsbedingungen gewaschen. Nach jedem Denaturierungsschritt wurden die Beads zusätzlich mit 1 ml Wasser gewaschen und einige Beads von jedem Typ aufbewahrt. Alle anderen Beads wurden für den nächsten Denaturierungsschritt (1. 5 min , 95 °C mit Wasser; 2. 10 min , 10 25 °C mit 10 mM PO_4 -Puffer/ 1 % SDS; 3. 2 mal 5 min , 25 °C mit 0,05 m NaOH; 4. 30 min 0,2 M NaOH / 0,1 % SDS) verwendet. Am Ende wurden die Beads im Vakuum getrocknet und aufbewahrt.

15

PCR und Reamplifikation der an die Glasoberfläche gebundenen DNA-Fragmente

20 Die auf die Glasoberflächen immobilisierte DNA, die 4 Mal gewaschen und denaturiert wurde (siehe oben), wurde für die PCR als Templat verwendet. Für die PCR wurde ein Mastermix hergestellt und nur ein Bead in jedes Reaktionsgefäß gegeben.

25 PCR Bedingungen für 1 Glasbead bzw. 10 ng Bisulfit behandelte DNA als Kontrolle: 0.2 µl Taq (1 Einheit), 0,2 µl dNTP (jeweils 25 mM) 0,2 mM Endkonzentration, 1 µl Primer1 (12,5 pmol/µl) 0,5 pmol/µl Endkonzentration; 1 µl

Primer2 (12,5 pmol/ μ l) 0,5 pmol/ μ l Endkonzentration; 2,5 μ l (10x)Puffer; 20,1 μ l H₂O

5 Primer:

ER1-B-U AGGAGGGGGAATTAAATAGA

ER1-B-L ACAATAAAACCATCCCAAATAC

Programm:

95°C/15:00; 95°C/1:00; 55 °C/0:45; 72°C/1:15; cycles:40;
72°C/10:00; 4°C/Endpunkt

10

Beispiel 2: Primerverlängerung eines immobilisierten
ESR1-Primers und Amplifikation des immobilisierten Ver-
längerungsprodukts mit Gen-spezifischen und generischen
15 (M13 Domäne) PCR-Primern.

Die folgenden aminomodifizierten Primer wurden auf PITC
modifizierte Glasbeads gebunden:

R75 MDR1-B-U-M13a-A GTAAAACGACGGCCAGTTAAGTATGTTGAAGAAAGATTATTGTAG 5'-Amino

R76 MDR1-B-L-M13b-A CAGGAAACAGCTATGACTAAAACTATCCCATAATAACTCCCAAC 5'-Amino

R77 ER1-B-U-M13a-A GTAAAACGACGGCCAGTAGGAGGGGGAATTAAATAGA 5'-Amino

R78 ER1-B-L-M13b-A CAGGAAACAGCTATGACACAATAAAACCATCCCAAATAC 5'-Amino

20

Der Immobilisierungspuffer wurde optimiert für das Auf-
tragen von NH₂ markierten Oligonukleotiden auf PITC deri-
vatisierte Lysinoberflächen. Hier wurde der Puffer für
die Immobilisierung in den gleichen Konzentrationen ver-
wendet: 0,5 molares EDTA; 2,1% Methylimidazol; 0,06%
25 Tween, Verwendung von 14 μ l(Puffer) + 7 μ l
(DNA/Oligonukleotid) Lösung, 5 pmol/ μ l Oligonukleotid
Endkonzentration

21 µl der Mischung wurden zu 42 mg PITC modifizierten
Beads (n=30) in Reaktionsgefäße gegeben und bei 28 °C ü-
ber Nacht inkubiert. Danach wurde mit 1% Ammoniaklösung
für 15 min deaktiviert. Nach dem Entfernen der Lösung
5 wurden die Beads getrocknet und unter Vakuum aufbewahrt.

Die PCR wurde in 0,2 ml Reaktionsgefäßen wie oben be-
schrieben im Eppendorf Cyclor durchgeführt; 5 Primer be-
ladene PITC-Beads wurden in jedes Reaktionsgefäß gegeben;
10 als Templat wurde PCR-Produkt verwendet (gereinigt, un-
verdünnt, 5'-Cy5 markiert):

5 Beads; 1 µl gereinigtes PCR-Produkt; 0,2 µl Taq (1 unit);
0,2 µl dNTP (jeweils 25 mM) 0,2 mM Endkonzentration;
2,5 µl (10x) Puffer; 22,1 µl H₂O

Programm: 95°C/15:00; 95°C/1:00; 55 °C/0:45; 72°C/1:15;
15 Zyklen:40; 72°C/10:00; 4°C/Endkonzentration

DNA:	ESR1 PCR Produkt
Immobilisierte Primer auf Glas- oberflächen	
R75 MDR1-B-U-M13a-A	1
R76 MDR1-B-L-M13b-A	2
R77 ER1-B-U-M13a-A	3
R78 ER1-B-L-M13b-A	4

Waschen (Puffer: 1 x PBS und 0,1 % SDS) und denaturieren
20 der Beads mit verlängerten Primern.

Vorgehen: 0,2 ml Reaktionsgefäße im Cyclor bei 96°C; Zu-
gabe von 100µl 1xPBS/0,1% SDS im Reaktionsgefäß, 5 min

Reaktionszeit, Reinigung der Beads, alte Lösung verwerfen und erneut 100 µl zugeben, diesen Schritt 4 Mal wiederholen; abschließend wurden die Beads 2 Mal mit Wasser gewaschen und im Vakuum getrocknet.

5

Zur Überprüfung der spezifischen Verlängerung wurden auch 2 Sorten Beads eingesetzt, auf denen Primeroligonukleotide immobilisiert waren, die nicht komplementär zum verwendeten Templat waren und deshalb nicht verlängert wurden.

10

1 Bead von jedem Reaktionsgefäß wurde verwendet zum Scannen der Cy5 und Cy3 Signale. Es wurde erwartet, dass die Cy5 Signale von Bead 1-4 (nur Bead 1-4 wurden mit dem Cy5 PCR-Produkt kontaktiert) verschwinden würden. Bei erfolgreicher Verlängerung auf dem Bead sind Cy3 Signale detektierbar, auch nach stringenter Denaturierung. Die gescannten Bilder hierzu sind unten abgebildet.

15

20 PCR zur Überprüfung der gebundenen verlängerten Primer nach dem Waschen

25

Die Primer von ESR1 und MDR1 mit Aminofunktion wurden auf PITC Beads immobilisiert. Alle Primer haben eine M13 Domäne und eine genspezifische Domäne. Nach der Immobilisierung wurden die Beads ohne zusätzliche Primeroligonukleotide in Lösung zur PCR Präparation gegeben mit einem PCR Produkt als Templat. Während der Zyklen werden die gebundenen Primer an einzelsträngige DNA der PCR Produkte angelagert und verlängert. Mit dieser PCR wird der Erfolg der Verlängerungsreaktion überprüft. ESR1 PCR Produkt wurde als Templat verwendet, das keine M13 Domäne aufweist. Die verwendeten Primer sind spezifisch für die verlängerten Primer (Ergebnisse siehe unten). Bei einer

30

erfolgten Verlängerung auf den Glasoberflächen sind nur die PCRs 3a und 4b positiv, ebenso die Kontrollen 7a und 7b. Nur diese Reaktionsgefäße beinhalten Templat für die entsprechenden Primer.

5

PCR Bedingungen:

1 Bead; 0.2 µl Taq;

0,2 µl dNTP (jeweils 25 mM) 0,2 mM Endkonzentration;

1 µl Primer1 (12,5 pmol/µl) 0,5 pmol/µl Endkonzentration;

1 µl Primer2 (12,5 pmol/µl) 0,5 pmol/µl Endkonzentration;

2,5 µl Puffer; 20,1 H₂O

Primer:

R61 M13-a GTAAAACGACGGCCAGT

R63 M13-b CAGGAAACAGCTATGAC

R83 ESR1-B-U AGGAGGGGGAATTAAATAGA

R84 ESR1-B-L ACAATAAAACCATCCCAAATAC

10

Templat:

1 Bead von der Verlängerung nach der Denaturierung wurde für den jeweiligen Versuch verwendet.

Programm:

15

95°C/15:00; 95°C/1:00; 55 °C/0:45; 72°C/1:15; Zyklen:40;
72°C/10:00; 4°C/Endpunkt

Immobilisierte Primeroligonukleotide auf Glasbeads wie im vorangehenden Experiment beschrieben.

20

Reaktionsgefäße:

Bead Nr.	1	2	3	4	keine DNA (-)	PCR Produkt ER1 (Nr. 4) 1:10 ⁴ (-)	PCR Produkt ER-M13 (Nr. 5) 1:10 ⁴ (+)
Primer:							
M13-Ua (61) ER1-L (84) Kontrollset für Bead Nr.3	1a	2a	3a	4a	5a	6a	7a
M13-Lb (63) ER1-U (83) Kontrollset für Bead Nr.4	1b	2b	3b	4b	5b	6b	7b

Agarosegel (aufgetragen jeweils 5µl) zu den PCR Ansätzen
5 mit Bead Nr. 1-7: siehe Fig. 3

Beispiel 3: In situ-Amplifikation des Gens ESR1 und Ana-
lyse des Methylierungsstatus einer CpG Position auf einem
10 Mikroarray.

1. Herstellung des Mikroarrays

Ein Glasobjektträger (Array) wurde chemisch modifiziert
15 und folgende Oligonukleotide mit einem handelsüblichen
Spotter in vierfacher Redundanz auf den Array aufgetragen
und mit dem 5'-Ende kovalent an die Oberfläche gebunden:

a) Das Oligonukleotid ESR1-B-U-M13a

20 GTAAACGACGGCCAGTAGGAGGGGGAATTAAATAGA, dessen kursiv

gedruckte Nukleotide mit dem zu amplifizierenden ESR1 Amplifikat (Position (1-20) übereinstimmen.

5 b) Die Oligonukleotide ESR1-CG (TAGGTTTTTCGGGGTAGGG) und ESR1-TG (TAGGTTTTTGCGGTAGGG) für die Bestimmung des Methylierungsstatus des CpG an Position 457-474 des ESR1-Amplifikats.

c) Die Bisulfitsequenz des ESR1 Gens (Acc. No. EP11141) ist nachfolgend dargestellt:

10

AGGAGGGGGAATTAAATAGAAAGAGAGATAAATAGAGATATATCGGAGTTTGGTACG
GGGTATATAAGGTAGTATATTAGAGAAAGTCGGTTTTTGGATTTCGTTTTTCGCGTTT
ATTTTAAGTTTAGTTTTTTTTTGGGTTATTTTAGTAGATTTTCGTGCGTTTTTCGTTT
TTTGGTCGTGAAATTTAGTTTTTATTTAGTAGCGACGATAAGTAAAGTAAAGTTTAG
15 GGAAGTTGTTTTTTGGGATGTTTAAATCGAGTTGTGTTTGGAGTGATGTTTAAGTTA
ATGTTAGGGTAAGGTAATAGTTTTTGGTCGTTTTTTAGTATTTTTGTAATGTATATG
AGTTCGGGAGATTAGTATTTAAAGTTGGAGGTTCCGGGAGTTTAGGAGTTGGCGGAGG
GCGTTCGTTTTTGGGATTGTATTTGTTTTTCGTCGGGTCGTTTCGGTTTTATCGGATTTCG
TAGGTTTTTCGGGGTAGGGTCGGGGTTAGAGTTCGCGTGTCGGCGGGATATGCGTTGC
20 GTCGTTTTTAATTTCCGGTTGTGTTTTTTTTTTAGGTGGTTCGTCGGTTTTTGAGTT
TTTTGTTTTGCGGGGATACGGTTTGTATTTTGTTCGCGTTACGGATTATGATTATG
ATTTTTTATATTAAAGTATTTGGGATGGTTTTATTGT

Die Verteilung der Oligonukleotide auf dem Array ist in
25 Fig. 5 dargestellt.

2. Insitu-Amplifikation von ESR1

30 Die Insitu-Amplifikation wurde in der von der Epigenomics AG entwickelten Hybridisierungskammer durchgeführt. Hierzu wurden 200 µl der PCR-Lsg. (50 ng Bisulfit behandelte humane genomische DNA, dNTPs 0,25 mM, 0,5 µM Primer ESR1-

B-L ACAATAAAACCATCCCAAATAC oder Primer ESR1-B-U-M13b
 CAGGAAACAGCTATGACACAATAAAACCATCCCAAATAC, 20 µl 10x Reak-
 tionpuffer, 5 U Taq-Polymerase (Qiagen, Hilden) in ein
 Reaktionsgefäß (Volumen 500µl) gefüllt und mit Mineralöl
 5 überschichtet. Das Reaktionsgefäß wurde in die Denaturie-
 rungsposition der Hybridisierungskammer gestellt und mit
 einem Teflonschlauch mit der Reaktions(Hybridisierungs)-
 kammer verbunden (s. Fig. 4). Die PCR-Reaktion erfolgte
 durch ein Hinundherpumpen der PCR-Lösung zwischen Denatu-
 10 rierungsposition und der Reaktions-(Hybridisierungs)-
 kammer. Dieser Vorgang wurde durch folgendes
 Pump/Temperaturprogramm gesteuert (Tab. 1, Schritt 1-8).
 Die PCR-Reaktion war beendet, nachdem die Programmschrit-
 te 2-7 38mal durchlaufen waren.

15

Tabelle: 1 Pumpen und Temperaturprogramm

	Schritt	Dauer	T-Kammer	Pumpe	T-Denat.	Position d. PCR-Lsg.
20	1	15min	55°C	aus	96°C	D
	2	1sec	55°C	ein	96°C	D->K
	3	1min	55°C	aus	96°C	K
	4	3min	70°C	aus	96°C	K
25	5	1min	96°C	aus	96°C	K
	Schritt 2-5, 5mal wiederholen					
	6	1sec	55°C	ein	96°C	K->D
	7	1min	55°C	aus	96°C	D
30	8	1sec	55°C	ein	96°C	D->K
	9	1min	55°C	aus	96°C	K
	10	3min	70°C	aus	96°C	K
	11	15min	70°C	aus	96°C	K
35	12	1sec	70°C	ein	25°C	K->D
	Schritt 6-10, 38mal wiederholen					
	8	oo	38°C	aus	25°C	D
	PAUSE					
40	Zugabe des Hybridisierungspuffers					
	9	3min	40°C	aus	96°C	D
	10	1sec	40°C	ein	96°C	D->K
	11	5min	40°C	ein	96°C	K<->K
45	12	1sec	40°C	ein	96°C	K->D
	Schritt 9-12, 70mal wiederholen					

3. Analyse des Methylierungsstatus

Nach der Insitu-Amplifikation (Schritt 8, Tab. 1) werden
5 400 µl Hybridisierungspuffer (6,9 x SSC, 2,7 Na-Laurylsarccosinat) zum PCR-Ansatz im Reaktionsgefäß (Denaturierungsposition) pipettiert und der Hybridisierungsprozess gestartet (Schritt 9, Tab. 1). Nach 70 Wiederholungen der Schritte 9-12 wird die Hybridisierung be-
10 endet und die Arrays werden gewaschen. Die getrockneten Arrays wurden in eine Fluoreszenzscanner analysiert und der Methylierungsstatus nach einer bekannten Methode bestimmt (Model F., Adorjan P., Olek, A., Piepenbrock, C., Bioinformatics. 2001, 17, Suppl1:157-64).

15

Kurze Beschreibung der Figuren:

Fig. 1: ESR PCR-Produkt

M = Größenmarker, 1 = PCR Set 1, 2 = PCR Set 2

20

Fig. 2: Reaktionsgefäße (Bead Nr. B):

B1: Beads nach der 2. Denaturierung;

B2: Beads nach der 3. Denaturierung;

B3: Beads nach der 4. Denaturierung;

25

B4: keine Beads, kein Templat;

B5: keine Beads, 1 µl Bisulfit DNA

Fig. 3:

Die Serie a zeigt die PCR Ansätze mit dem Kontrollset für
30 Bead Nr. 3. Da die Kontrolle 6a (Templat ohne M13 Domäne) negativ ist und die Kontrolle 7a (Templat mit M13 Domäne) positiv ist, kann auf eine erfolgreiche Verlängerung geschlossen werden. An der Kontrolle 6b kann man sehen, dass die verwendeten Primeroligonukleotide auch Templat
35 ohne M13 Domäne reamplifizieren.

Fig. 4:

P Pumpe

T Schläuche

5 K Reaktionskammer

D Denaturierungsposition

C Chip

Fig. 5:

10 Schematische Darstellung des Chip Layouts:

Die schwarzen Punkte stellen die Positionen der immobilisierten Primer da (B). Die Lage der

Methylierungsdetektionsoligos auf dem Chip werden durch weiße Punkte TG-Oligonukleotid (TAGGTTTTTGGGGTAGGG) und

15 graue Punkte CG-Oligonukleotid (TAGGTTTTTCGGGGTAGGG) dargestellt (A).

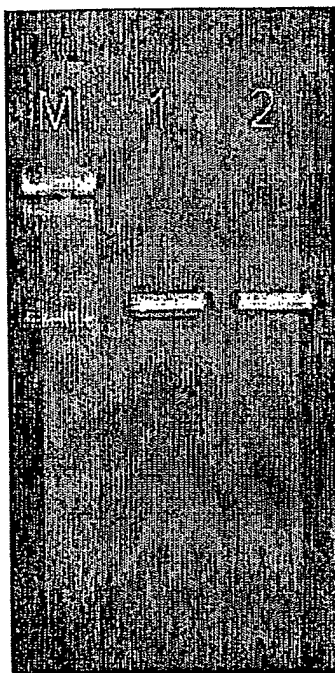
Patentansprüche

1. Verfahren zum Nachweis von DNA-Polymorphismen und Cytosin-Methylierung, dadurch gekennzeichnet, dass man die folgenden Schritte ausgeführt:
- 5 a) man gewinnt die zu untersuchende DNA aus einer Probe;
- b) die zu untersuchende DNA wird in einer Polymerase-
10 raktion amplifiziert, wobei ein Primer in Lösung vorliegt und ein Primer an die Oberfläche einer Festphase gebunden ist und wobei mindestens einer der Primer aus zwei Domänen besteht, wobei die am 3'-Ende befindliche an die zu untersuchende DNA hybridisiert, während die am 5'-Ende befindliche nicht hybridisiert;
- 15 c) die in Schritt c) amplifizierte DNA wird erneut amplifiziert, wobei die Primer dieser zweiten Amplifikation an die am 5'-Ende befindliche Domäne mindestens eines der ersten Primer hybridisieren oder zu ihr identisch sind und wobei diese Primer für die zweite Amplifikation mit einer nachweisbaren Markierung versehen sind;
- 20 d) die Amplifikate werden an Oligonukleotide und/oder PNA-Oligomere hybridisiert, welche an eine Festphase gebunden sind, die in der Amplifikation nicht als Primer fungieren, und aus der Hybridisierung auf Sequenzmerkmale oder Methylierungsmuster der zu untersuchenden DNA geschlossen.
- 30 2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man in Schritt a) die zu untersuchende DNA nach der Gewinnung chemisch und/oder enzymatisch behandelt.
- 35

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Primer der ersten Amplifikation (Schritt b) und die Oligonukleotide (Schritt d) auf derselben Festphase immobilisiert sind.
- 5 4. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Festphase eben ist.
- 10 5. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Festphase aus Glas, Metall, insbesondere Gold oder Kunststoff ist.
- 15 6. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass Beads als Festphase verwendet werden, wobei jeder Bead unterschiedlich codiert ist.
- 20 7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass die Beads über Fluoreszenzfarbstoffe, über absorbierende Farbstoffe, über Chemiluminiszenz, über Transponder, über Nuklide codiert sind oder über chemische Markierungen, welche sich massenspektrometrisch nachweisen lassen.
- 25 8. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 5-7, dadurch gekennzeichnet, dass die Oberfläche derart chemisch behandelt ist, dass die Oligonukleotide und Primer kovalent daran gebunden werden können.
- 30 9. Vorrichtung, bestehend aus
 - a) einer Oberfläche, auf welcher Primeroligonukleotide mit ihrem 5'-Ende immobilisiert sind und zusätzlich Oligonukleotide und/oder PNA-Oligomere, welche von einer Polymerase nicht verlängert werden können;
 - 35 b) einer Kammer, wobei die Oberfläche eine Wand dieser Kammer bildet;

- c) einer Temperierungseinheit, welche die Kammertemperatur steuert;
- d) einem System, welches der Kammer Flüssigkeiten zuführt.

Fig. 1



2/4

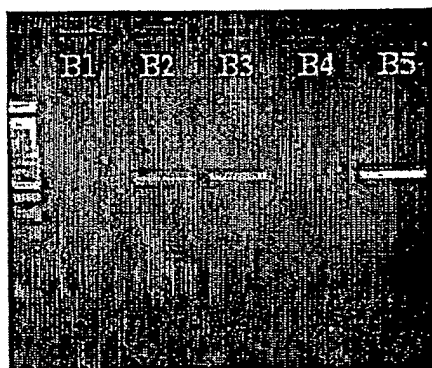
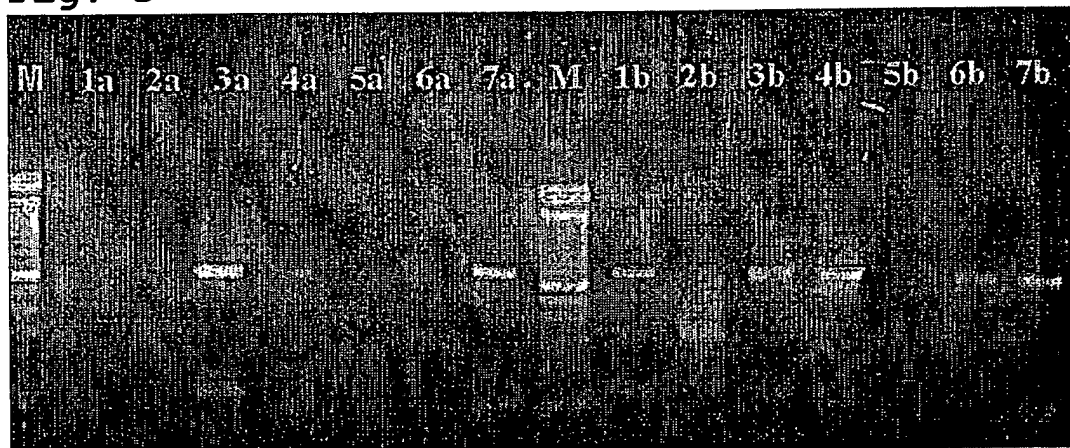
Fig. 2**Fig. 3**

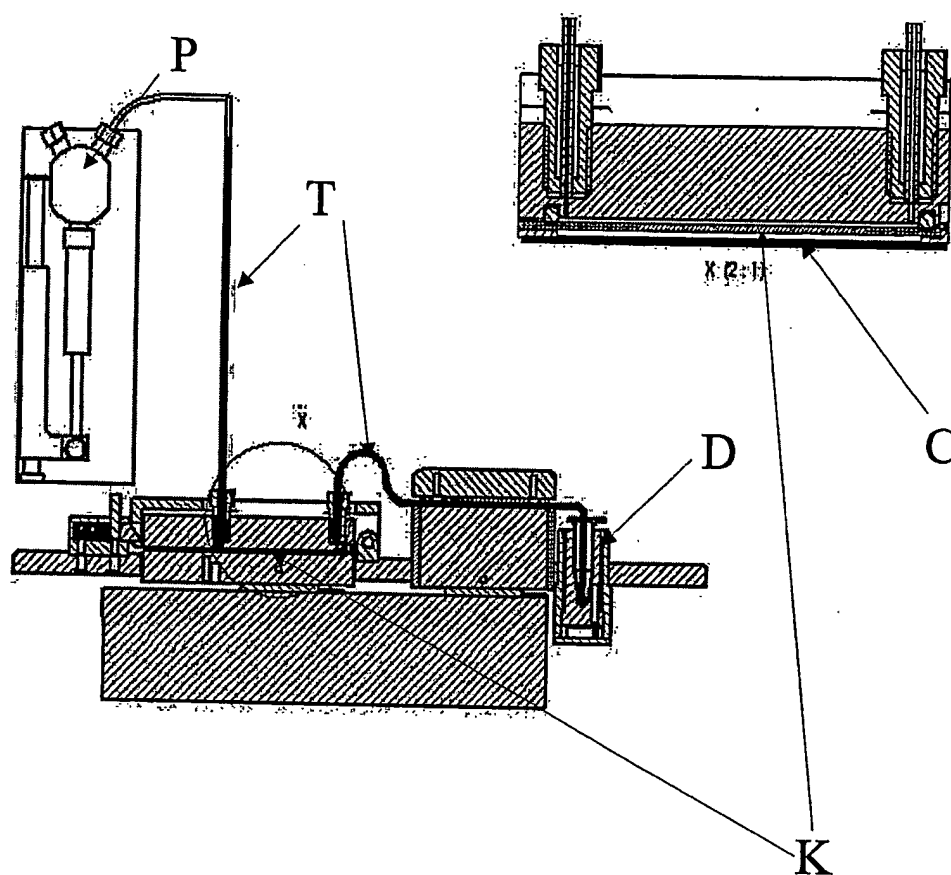
Fig. 4

Fig. 5